云 南 植 物 研 究 1999, 21 (4): 491～496
Acta Botanica Yunnanica

影响农杆菌介导的柑桔基因转化因素研究*

韩美丽，陆荣生，朱积余，丘小军，黄华艳
(广西林业科学研究院，广西 南宁 530001)

摘要：以柑桔（*Citrus*）中的枳壳、甜橙、柠檬、四季桔上胚轴为对象，进行了农杆菌介导的柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因转化影响因素研究，最终将衰退病病毒外壳蛋白基因转入枳壳。研究结果表明：以卡那霉素为选择试剂，且外植体水平放置时，枳壳的选择浓度为 50μg/mL，其它品种为 20～30μg/mL。外植体与农杆菌的共培养时间 3 d 最好，70～100μmol/L 的酚类化合物（As）的添加对外植体 Gus 瞬时表达阳性率有明显促进作用。转化所用外植体年龄以 20 d 最好，品种之间抗性芽产生率与 Gus 阳性芽产生率明显不同。以质粒 DNA NcoⅠ酶切产物为探针，进行了 Southern blot 分析，结果表明外源基因已稳定整合到了枳壳植株的核基因组中。

关键词：农杆菌；柑桔；转化
中图分类号：Q 943　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253－2700(1999)04－0491－06

Studies on Factors Effecting Gene－transformation by *Agrobacterium*－mediated in *Citrus*

HAN Mei－Li, LU Rong－Sheng, ZHU Ji－Yu, QIU Xiao－Jun, HUANG Hua－Yan
(*Guangxi Academy of Forestry*, Nanning 530001)

Abstract: The factors affecting *Agrobacterium* － mediated gene － transformation of epicotyls of *Citrus in vitro* are studied in this paper. Transgenic *Poncitrus trifoliata* with CTV－cp gene were obtained. The main results are as follows: As a selectable agent, concentration of Kanamycin is 20～30μg/mL for *Citrus* except *P. trifoliata* , which is 50μg/mL. The optimal cocultivation time of explants & *Agrobacterium* is 3 days. Gus transient expression frequency was promoted, when the concentration of acetosyingone is 70～100 μmol/L. Gustransient expression frequency is higher in epicotyls from 20d seedling. Under the same transformation condition , the rate of explant with resistant shoot and the rate of explant with Gus positive shoot are different in different *Citrus* species. Extral gene is proved to be into *P. trifoliata* by southern blot examination with probe of plasmind pGA482GG cut by Nco IE.

Key words: *Agrobacterium*; *Citrus*; Transformation

遗传转化技术是 80 年代兴起的一门新型育种技术，自它问世以来，就以其严格的定向性、高效性受到育种工作者的欢迎。常用的遗传转化方法主要有生物法、物理法、化学法。在这 3 种方法中，以农杆菌介导的转化方法应用最为广泛，所取得的转基因植株最多

* 基金项目：广西自然科学基金资助项目
收稿日期：1998－10－13，1999－03－09 接受发表

(Murray, 1992)。柑桔是一种重要水果，在我国广为种植。柑桔生产中面临的一个较为严重的病害是柑桔衰退病病毒，它由桔蚜、棉蚜传播。常见的防治措施如：选用耐病砧木、烧毁病株、喷洒农药杀虫等虽可切断虫源，但均不能从根本上解决问题。遗传转化技术的出现为这一问题的解决提供了新方法。我们以柑桔生产中常见的甜橙、柠檬、枳壳和四季桔为对象，农杆菌为载体，柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因为目的基因，进行了柑桔遗传转化研究，以期为柑桔转基因研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

取甜橙（*C. sinensis*）、柠檬（*C. limon*）、枳壳（*Poncirus trifoliata*）、四季桔（*C. microcarpa*）种子，经常规方法消毒，播种于1/2 MS固体培养基中，25~30℃黑暗下萌发待用。

2.2 农杆菌菌株与质粒

农杆菌菌株为EHA101，含质粒载体pGA482GG。质粒上插有35s启动子驱动的外源目的基因：柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因（CTV－cp）及Gus、NTP－Ⅱ基因，CTV－cp基因全长669bp，插入位点为NcoⅠ位点。该质粒图谱如下：

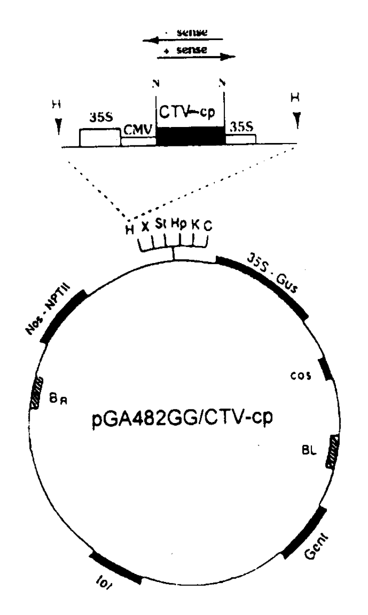


图1 携带柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因（CTV－cp）的质粒pGA482GG

Fig.1 Schematic representation of the pGA482GG transformation plasmid.

The 669bp reading frame of the CTV－cp gene was PCR cloned in both directions（＋sense and －sense）into the NcoⅠ（N）site of the pUC18cpexp. This produced an expression cassette consisting of the cauliflower mosaic virus 35s gene regulatory elements（35s）and cucumber mosaic virus coat protein gene 5'－untranslated region（CMV）for enhanced expression. The expression cassette was then cloned into the HindⅢ（H）site of pGA482GG.

农杆菌固体平板培养基为YEP附加卡那霉素50 μg/mL，拟潮霉素60μg/mL，琼脂1.5%。液体培养基与固体培养基相同，不加琼脂。转化前挑单菌落接种于50mL液体培养基中，28℃黑暗下120r/min振荡培养至对数期（OD_{600} = 0.8~1.0），然后3000 r/min离心10 min，除去上清液，用再悬浮液悬浮待用。

1.3 转化方法

将实生苗上胚轴切0.5 cm长，在农杆菌悬浮液中浸泡20 min，滤纸吸去多余的菌液，放置培养基上，26~28℃黑暗下共培养2~3d，转至选择培养基上选择培养。为了提高转化效率，进行了选择剂水平确定及不同浓度酚类化合物、共培养时间、实生苗苗龄对外植体Gus表达阳性率的影响研究。悬浮培养液、共培养基、分化培养基的基本成分均为MT，分化培养基附加成分为：

甜橙 BA 2mg/L；柠檬 BA 2mg/L + NAA 0.5mg/L；四季桔 BA 1mg/L；枳壳 BA 5mg/L + NAA 0.5mg/L。所有选择培养基中均含先锋霉素 300mg/L 及相应的卡那霉素（Km）。选择过程均在 26～28℃光照下进行，光照强度 1 400 lx，光照时间每天 12 h。

1.4 测定方法

Gus 基因表达测定：采用组织化学染色法（傅荣昭等，1994）。取外植体，切 2 mm 厚薄片，放固定液 30 min，然后放入 Gus 染色液中 37℃ 4 h，颜色变兰者为 Gus 阳性。

植物 DNA 及质粒 DNA 提取分别采用 SDS 法、碱裂解法（孙敬三，1995）。质粒 DNA 经 NcoⅠ酶切消化后，采用 DiG 标记法制成探针（DiG DNA Labeling and Detection User's Guide，1989）。

PCR 反应采用 25μL 反应体系。反应体系中含：植物 DNA 20ng，dNTPS 200μ mol/L，Primer1 与 Pruimer 2 各 0.1μ mol/L，TaqDNA 酶 1 单位，10×PCR 缓冲液。样品先 94℃变性 6 min，然后经 94℃1 min、56℃1 min 30 s、72℃1 min 30 s 共 35 个循环，最后 72℃延伸 8 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳，并在紫外透射仪上分析结果。引物 Primer1：5′－3′CGA TGT GCG TCA GTT GAG TA；Primer 2：5′－3′CG TGT GTT GAA TTT CCC AAG，二者分别来自 CTV－cp 基因序列 130～149、150～169 片段，预期扩增长度 539bp。

Southern blot 分析采用 DiG 成套试剂盒试剂及反应条件（DiG DNA Labeling and Detection User's Guide，1989）。植物 DNA 经 NcoⅠ酶切消化后，4℃下 0.8% 琼脂糖上电泳 12h，经变性，转移至 NC 膜上。烘干膜后进行预杂交、杂交及显色。杂交带预期位点为 669bp。

2 结果与讨论

2.1 卡那霉素对不同柑桔上胚轴出芽的影响

实验结果表明：外植体在培养基中放置方式不同，对卡那霉素（Kanamycin，Km）的承受能力也不同。以形态学下端垂直插入培养基方式培养时，外植体对 Km 的承受水平明显高于水平放置时的承受水平。竖放时，Km 100μg/mL 时，甜橙芽分化率下降不大，为 44.4%，至 Km 180μg/mL 时，芽分化率才完全受到抑制。枳壳、柠檬与甜橙相似，但垂直放置时它们对 Km 的耐受力更强，180μg/mL 的 Km 加入量，仍不能完全抑制芽分化。而各品种水平放置时，除枳壳外，30μg/mL 的 Km 加入足以使另 3 个品种外植体出芽被完全抑制，且外植体两端变白色、木质化，将之移入不含 Km 的培养基中也不再出芽。枳壳 Km 耐受性高于其它品种，Km 50μg/mL 时，出芽才被完全抑制。外植体放置方式对 Km 的承受力差别可能在于：平放时，Km 从培养基到外植体的运输距离短，因而细胞中 Km 的有效浓度高；竖放时，Km 从培养基到外植体的运输距离长，故 Km 的有效浓度低。因而在选择培养时应注意外植体的放置方式。

2.2 外植体与农杆菌共培养时间对外植体 Gus 瞬时表达效果的影响

共培养时间长短的研究是农杆菌转化中的一个最基本的问题。从表 2 可看出，外植体与农杆菌共培养时间的长短对外植体 Gus 瞬时表达阳性率有很大的影响，主要表现在：（1）共培养 0 d，所有品种均无 Gus 阳性外植体存在；（2）共培养 1d，各品种均有 Gus 阳性外植体存在，品种间 Gus 阳性外植体所占比例不同。随着共培养天数的延长，Gus 阳性外植体所占比例也随之上升，共培养 4 d 的 Gus 阳性率稍大于共培养 3 d，但共培养 4 d

时，农杆菌生长过于旺盛，在选择培养时难于抑制，因此，最好的共培养时间应为3 d；(3) 在同样共培养条件下，Gus阳性外植体所占比例因植物品种不同而异，表现为枳壳第一、四季桔第二、甜橙最低，由此可预测出这几个柑桔品种的转化率存在明显的基因型差异。

表1 卡那霉素对柑桔上胚轴芽形成的影响

Table 1 Effect of Kanamycin on shoot formation of epicotyls of *Citrus* species

外植体放置方式 Posture orientation of explants	卡那霉素浓度 (μg/mL) Concentration of Km	外植体出芽率（%） Frequency of shoot formation			
		甜橙 *C. sinensis*	柠檬 *C. limon*	四季桔 *C. microcarpa*	枳壳 *P. trifoliata*
水平放置 Horizontal	0	62.2	57.8	31.3	66.7
	30	0	0	0	4.4
	50	0	0	0	0
	70	0	0	0	0
形态学下端插入培养基 Apical end of the segment protruding	0	57.8	53.3	22.2	60.0
	100	44.4	46.7	6.7	51.1
	140	6.7	15.6	0	28.9
	180	0	2.2	0	3.4
	200	0	0	0	0

* 各处理外植体数均为45； * No. of explants per treatment is 45.

表2 共培养时间对柑桔外植体Gus基因瞬时表达阳性率的影响

Table 2 Effect of cocultivation time on frequency of explants with Gus expression transient positive of *Citrus* species

共培养时间 (d) Time of cocultivation	Gus阳性外植体百分率（%） Rate of explants with Gus positive			
	甜橙 *C. sinensis*	柠檬 *C. limon*	四季桔 *C. microcarpa*	枳壳 *P. trifoliata*
0	0	0	0	0
1	3.0	3.0	6.7	13.3
2	10.0	13.3	16.7	23.3
3	16.7	20.0	26.7	43.3
4	16.6	23.3	30.0	46.7

* 各处理外植体数为30； * No. of explant per treatment is 30.

2.3 酚类添加剂的浓度对外植体Gus阳性率的影响

许多研究表明，酚类化合物的添加对农杆菌向植物细胞的附着、转移有较大的促进作用，因而有助于转化效率的提高（Kaneyoshi *et al*，1994，Nobyoshi S *et al*，1990）。在本研究中。未加酚类添加剂时，除枳壳Gus阳性率稍高外，其余品种均较低，因而我们在农杆菌悬浮液中添加了不同浓度的乙酰丁香酮（As）进行了研究，结果见表3。

从表3可看出，As的添加有助于Gus瞬时表达阳性外植体百分率的提高，提高幅度及最适浓度因品种而异。甜橙、枳壳As 100 μmol/L时，Gus阳性外植体百分率最高，分别达64.0%、84%；As浓度超过100 μmol/L，促进作用逐渐下降；As 190 μmol/L时，开始有抑制作用。柠檬与四季桔受As影响较小，As 70 μmol/L时，Gus阳性外植体百分率最高，分别为28%、36%，以后随着As浓度的升高，促进作用减弱，Gus阳性率逐渐下降，

且有一些外植体变黄死亡。品种之间比较而言，枳壳的 Gus 阳性外植体百分率在对照及各个浓度下均属最高。由此可看出 As 的促进作用与品种的基因型有关。在植物方面，As 的加入只是促进了与农杆菌天然亲和力有关的基因的高效表达，如果这种天然亲和力本身低，则 As 的加入往往收效不大，且酚类化合物对植物细胞也有一定的杀伤力。

表 3　酚类化合物浓度对不同柑桔品种外植体 Gus 阳性率的影响

Table 3　Effect of concentration of As on frequency of explants with Gus transient expression positive of *Citrus* species

As 浓度（μmol/L）Concentration of As	Gus 阳性外植体百分率（%）Rate of explants with Gus positive			
	甜橙 *C. sinensis*	柠檬 *C. limon*	四季桔 *C. microcarpa*	枳壳 *P. trifoliata*
0	12.0	16.0	24.0	48.0
30	32.0	20.0	28.0	52.0
70	56.0	28.0	36.0	64.0
100	64.0	24.0	28.0	84.0
130	56.0	16.0	28.0	76.0
160	36.0	8.0	16.0	52.0
190	16.0	0	8.0	40.0

* 各处理外植体数为 25 个；* No. of explant per treament is 25.

2.4　外植体年龄对 Gus 瞬时表达效果的影响

前人的许多研究表明外植体年龄对转化有较大的影响，主要表现在：带活跃生长细胞的分生组织转化率高于其它组织。从表 4 可看出，随着外植体年龄在一定范围内的增大，各品种 Gus 阳性外植体所占比例均呈下降趋势，尤其是苗龄大于 40d 以后，Gus 阳性比例急剧下降。其原因可能是外植体年龄增大，细胞老化，农杆菌对之敏感性下降；另外，苗龄太小或太大，外植体自然死亡率也高，这些因素导致了总的 Gus 阳性率的下降。从实验结果看，转化的最适苗龄为 20～30d。

表 4　外植体年龄对 Gus 瞬时表达效果的影响

Table 4　Effect about age of explants on frequency of Gus positive in *Citrus*

外植体年龄（d）Age of explants（d）	外植体 Gus 阳性百分率（%）Rate of explants with Gus positive			
	甜橙 *C. sinensis*	柠檬 *C. limon*	四季桔 *C. microcarpa*	枳壳 *P. trifoliata*
10	72.0	32.0	44.0	80.0
20	74.0	34.0	46.0	81.0
30	62.0	28.0	36.0	74.0
40	23.0	14.0	16.0	32.0
50	4.0	0	0	10.0

2.5　选择培养过程中，抗性芽产生率与转化率之间的关系研究

共培养 3 d 所调查的不同品种的 Gus 阳性外植体所占比例，仅是 Gus 基因瞬时表达的情况，外源基因与植物基因组的结合是极不稳定的，在选择过程中常存在外源基因丢失现象，这种现象的存在，使实验结果出现一些矛盾现象，即共培养后 Gus 瞬时表达率高而经长期选择后得到的转化植物却很少，甚至没有。为此，我们进行了 Gus 阳性芽产生率与抗

性芽产生率比较研究，结果见表5。

从表5可看出，只以抗性芽产生率为选择标准，则每一个品种均有一定比例的抗性芽产生，但经Gus检测，则只有枳壳及四季桔有Gus阳性芽，枳壳Gus阳性芽产生率最高，达到32.0%，而四季桔则很少，只有0.7%，其它2个品种无Gus阳性芽。这种现象的产生即可能与外源基因稳定整合与瞬时表达所需的植物生理状态不同有关，也可能与植物品种对Km的敏感性有关，需在这方面进一步研究以提高转化效率，并且在转化研究不能仅以抗性产生率为选择标准，必需经过Gus检测及分子检测，以排除假抗性及假阳性芽。

表5 柑桔种之间抗性芽产生率、Gus阳性芽产生率比较

Table 5 The comparison about rate of explants with Gus positive shoot and rate of explant with anti - Km shoot

品种 Species	外植体数 No. of explants	具抗性芽的外植体百分率（%） Rate of explants with Anti - Km shoot	具Gus芽阳性的外植体百分率（%） Rate of explants with Gus positive shoot
甜橙 *C. sinensis*	200	6.5	0
枳壳 *P. trifolitat*	200	41.0	32.0
四季桔 *C. microcarpa*	150	7.6	0.7
柠檬 *C. limon*	175	5.7	0

2.6 转化体的分子鉴定

在Gus测定阳性基础上，以枳壳及四季桔的Gus阳性无性系为对象，进行了PCR扩增及Southern blot分析，以鉴定外源基因是否稳定整合到了植物基因组。从PCR扩增反应结果可看出，所测定的枳壳无性系提取DNA与质粒DNA均在预期的539bp位点处出现同一条扩增带，对照及四季桔均无，由此可进一步断定所得枳壳Gus阳性无性系确为转基因无性系。

从Southern blot杂交结果显示：所测定的6个枳壳PCR扩增阳性无性系与质粒均在预期的669bp位点处出现同一条杂交带，对照则无，因而可以证明，柑桔衰退病病毒外壳蛋白基因已稳定整合到了植物基因组中，所获得的枳壳植株确为转基因植物。四季桔仅得1个Gus阳性无性系，经PCR检测证明为假阳性，因而尚需进一步研究。

参考文献

孙敬三主编，1995. 植物细胞工程手册［M］. 北京：中国科学技术出版社，297~298

傅荣昭，孙勇如，贾士荣主编，1994. 植物遗传转化技术手册［M］. 北京：中国科学技术出版社，168~170

Biochemica Boehringer Mannheim, 1989. DiG DNA Labeling and Detection Kit User's Guide [M]. German: Boehringer Mannheim company, 3~15

Kaneyoshi J, Kobayashi K, Nakamura, *et al*, 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf) [J]. *Plant Cell Reports*, **13**: 514~545

Murray J A H, 1992. Transgenests [M]. John Wiley & Sons Ltd, 189~201

Nobuyoshi S, Akiko Toyoda K, Jun N *et al*, 1990. Control of expression of Agrobac - terium vir genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **9**: 6684~6688